基础研究

Notch配体在哮喘气道重塑小鼠中的表达及布地奈德的干预作用

赖天文[1],吕莹莹[2],王少冰[1],吕权超[1],陈 敏[1],吴 东[1],吴 斌[1]
广东医科大学附属医院[1]呼吸与危重病学科,[2]康复医学科,广东 湛江 524001

摘要:目的 探讨哮喘小鼠气道重塑发病过程中Notch配体Jagged1及Jagged2在肺组织的表达变化及布地奈德的干预作用。**方法** 清洁级C57BL/6雄性小鼠30只随机分为对照组、哮喘气道重塑组、布地奈德干预组,每组各10只。建立哮喘气道重塑模型,利用酶联免疫吸附测定、免疫组化、Western blot等方法,检测炎症因子、气道重构和Jagged1及Jagged2表达变化,并分析它们的相关性。**结果** 哮喘气道重塑组小鼠肺组织的炎症因子IL-4/5/13、Jagged1及Jagged2表达明显增加(P<0.01或0.001);布地奈德干预后,气道炎症、气道粘液分泌及胶原沉积明显缓解(P<0.01),Jagged1及Jagged2表达明显降低(P<0.05或0.01);Jagged1及Jagged2表达水平与炎症因子、气道重构呈正相关(P<0.001)。**结论** Notch配体Jagged1及Jagged2表达增加可能参与了哮喘小鼠气道炎症反应及气道重塑。布地奈德能抑制哮喘气道炎症反应及气道重塑可能与降低Jagged1及Jagged2的表达有关。

关键词:哮喘;Notch配体;气道重塑;布地奈德

Expression of Notch ligands and the effects of Budesonide in airway remodeling in mice with asthma

LAI Tianwen[1], LV Yingying[2], WANG Shaobing[1], LV Quanchao[1], CHEN Min[1], WU Dong[1], WU Bin[1]
[1]Department of Respiratory and Critical Care Medicine, [2]Department of Rehabilitation Medicine, Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China

Abstract: Objective To investigate expression of Notch ligands (Jagged 1 and Jagged 2) and the effects of Budesonide in airway remodeling in mice with asthma. **Methods** Thirty C57BL/6 male mice were randomly divided into 3 groups (10 mice/group) including control group, asthma group, and Budesonide group. The pathological changes of the airway were assessed by hematoxylin and eosin staining. The cytokines in the lung homogenate were assessed by ELISA. The immunohistochemistry and western blot was used to estimate the expression of Jagged1 and Jagged2 in the lung tissues. The correlations among them were also analyzed. **Results** Compared with the control group, the expressions of IL-4/5/13, Jagged1 and Jagged2 in the lung tissues were significantly increased (P<0.01 or 0.001), but decreased significantly in the Budesonide-treated asthma group. Both Jagged1 and Jagged2 were positively correlated with the cytokines, mucus production and collagen deposition (P<0.001). **Conclusion** Jagged 1 and Jagged 2 may be associated with airway remodeling in mice with asthma. Budesonide can improve airway remodeling, possibly by decreasing the expression of Jagged1 and Jagged2.

Key words: asthma; airway remodeling; Notch pathway; budesonide

近20年来,全世界哮喘的患病率和死亡率均呈逐渐上升趋势,造成巨大的社会和经济负担,已经引起全球的广泛重视。WHO将其列入21世纪急需防治的疾病之一,成为亟待攻克的医学难题[1]。所以,研究其发病机理,探讨药理作用机制具有重要的意义。

哮喘的发病机制相当复杂,至今尚未完全阐明。哮喘发病是多种因素,多种机制共同作用的结果。气道重塑是哮喘除气道慢性炎症之外的另一重要特征。气道重塑是由多种因素导致的结构细胞不断去分化、趋化、迁移和成熟,从而表现为结缔组织的沉积和气道结构的改变[1]。近年来研究表明:Notch信号在细胞分化和个体发育中起决定性的作用,成为发育学、细胞生物学、免疫学、肿瘤学等多个领域的研究热点。Notch信号通路参与哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺癌、肺间质病变、肺动脉高压等多种肺部疾病的病理生理过程,阻断或激活这一途径可影响某些肺部疾病的病理改变与预后,因而在肺部疾病研究领域引起了越来越多的关注[2-4]。然而,Notch信号通路在气道重塑中的作用尚未阐述清楚。糖皮质激素是目前最有效的抗炎药物,但对防治气道重塑机制尚未完全阐明,糖皮质激素能否调控Notch信号通路活性而干预气道重塑?这一问题亦尚

收稿日期:2016-03-03
基金项目:广东省医学科研基金项目(A2012430);广东医学院科研基金项目(2011031)
作者简介:赖天文,博士,主治医师,E-mail: laitianwen2011@163.com
通信作者:吴 斌,教授,硕士研究生导师,E-mail: wubin621011@126.com

未阐明。为此,本研究通过建立哮喘小鼠气道重构模型,观察Notch配体Jagged1及Jagged2在气道内的表达水平,以及布地奈德干预对其表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

乳化氢氧化铝(PIERCE,美国);卵白蛋白(OVA,Grade V,Sigma,美国);布地奈德混悬液(阿斯利康制药);免疫组化兔抗小鼠Jagged1及Jagged2多克隆抗体购于武汉优尔生商贸有限公司;蛋白裂解液、SP试剂盒及DAB显色剂购于碧云天生物技术有限公司;402AI型超声雾化器(上海医疗鱼跃);光学显微镜(日本OLYMPUS)。

1.2 动物分组和哮喘模型的建立

30只6~8周清洁级C57BL/6雄性小鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,随机分为对照组、哮喘重塑组、布地奈德治疗组,每组10只。参照Shen等方法并加以改进[5-6],哮喘重塑组及布地奈德治疗组小鼠在实验第1天和第7天时分别予以腹腔注射0.2 mL混合液(含有80 μg OVA和100 mg氢氧化铝)使小鼠致敏。实验第24天起,将两组小鼠分别置于自制的有机玻璃箱中,给予1.5% OVA雾化吸入激发小鼠,45 min/d,连续18 d。布地奈德治疗组,除了上述相同操作外,从第1次激发起,在激发前1 h予布地奈德1 mg雾化吸入治疗。对照组腹腔注射及激发均用生理盐水,操作方法同上述。在小鼠末次雾化结束后24 h内,腹腔注射1.5%戊巴比妥0.2 mL麻醉后,心脏取血处死3组小鼠。

1.3 细胞计数及分类

小鼠颈前暴露气管,做一横形切口,插入改良的18 G气管插管针。用0.4 mLPBS缓冲液灌洗3次,回收率在80%以上。取200 μL肺泡灌洗液(BALF)加入200 μL白细胞计数液中,在显微镜下计数白细胞总数。随后4 ℃、6000 r/min离心5 min,收集上清液储存于−80 ℃,用于检测细胞因子。将BALF离心后的沉淀重新悬于150 μL PBS中,混匀,制备2张涂片,按说明书进行瑞氏-吉姆萨染色(北京雷根生物技术有限公司)。每个标本计数200个细胞,按嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞进行分类[6]。

1.4 肺组织匀浆制备

称取肺组织30~50 mg,加入10 μL/mg的蛋白裂解液(碧云天生物公司),利用组织匀浆机(上海净信科技公司)进行肺组织匀浆90 s,随后以4 ℃ 12 000 r/min离心10 min。收集上清−80 ℃保存,用于检测细胞因子。

1.5 肺组织染色及半定量图像分析

通过气管插管向左肺灌注4%福尔马林固定,石蜡包埋,取石蜡包埋的组织切片,常规作HE染色、免疫组化、Masson三色染色及过碘酸-雪夫氏染色(PAS)染色。HE染色观察气管炎症浸润程度,行半定量评分[6]。0分:支气管周围几乎无炎症细胞;1分:支气管周围散在少许炎症细胞;2分:支气管周围较多分布不均的炎症细胞但未聚集成团;3分:支气管周围大量炎症细胞,分布较均匀,但少见聚集成团;4分:支气管周围大量炎症细胞聚集成团。免疫组化显色为细胞核或浆光镜下出现棕黄色产物者为阳性反应。在高倍镜(10×40)视野下进行观察,应用Image-pro plus图像分析软件分析计算阳性细胞占总细胞的百分比。胶原染色观察胶原沉积情况,胶原沉积呈蓝色,测定支气管周围胶原面积,结果以单位长度基底膜的胶原面积($\mu m^2/\mu m$)表示[6]。PAS染色观察粘液分泌情况,阳性物质呈紫红色,进行半定量评分:0分:气道上皮无阳性着色;1分:轻度上皮着色;2分:中度上皮着色;3分:重度上皮着色;4分:上皮着色成团、层叠[6]。

1.6 细胞因子检测

按照美国RD公司的ELISA试剂盒操作步骤,检测肺组织匀浆的IL-4,IL-5和IL-13蛋白水平。IL-4,IL-5和IL-13的最低检测浓度分别为:2 pg/mL,7 pg/mL和1.5 pg/mL。

1.7 Western Blot检测

取肺组织蛋白50 μL,继而加等体积上样缓冲液,在沸水中煮约10 min后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜。牛奶室温封闭1 h,加稀释后的特异性抗体Jagged1及Jagged2,4 ℃孵育过夜,第2天用含0.1%吐温−20缓冲液洗膜3次,5 min/次,随后加对应的二抗,上述缓冲液再洗3次,5 min/次后,进行显色、曝光。应用Image-pro Plus图像分析软件进行半定量分析。

1.8 统计学分析

数据采用Graphpad prism 5.0软件(CA, USA)进行分析,结果以均数±标准差表示。多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验,两变量的相关程度用Spearman相关分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

哮喘重塑组小鼠于激发早期表现躁动,出现搔抓面部、头及躯干,进而呼吸加快;后期则表现为呼吸急促、前肢缩抬、少动,反应迟钝。连续激发多次后,小鼠出现进食量相对减少、体质量减轻。布地奈德组多数小鼠未见明显异常反应,仅个别出现点头呼吸、头面部搔痒等表现。对照组小鼠未出现上述表现。

2.2 布地奈德缓解OVA诱导的哮喘气道炎症

哮喘重塑组BALF的细胞总数比WT组明显升高

(P<0.001),分类计数各细胞百分比也明显升高(P<0.001),而布地奈德治疗后,BALF的细胞总数及嗜酸性粒细胞比例明显下降(P<0.001,图1A, B)。肺组织HE染色得到一致的结果,哮喘重构组小鼠气道和血管周围见大量炎症细胞浸润,而布地奈德治疗后的小鼠气道周围炎症细胞浸润减少(图1C-F)。

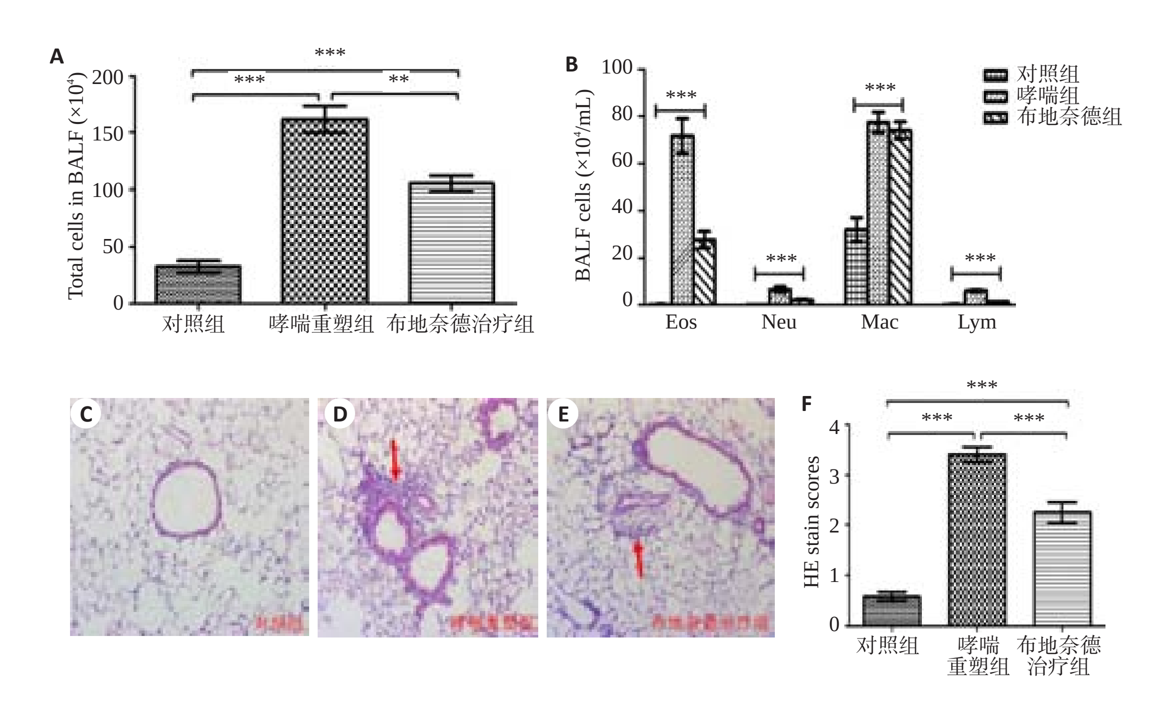


图1 布地奈德明显缓解了哮喘小鼠气道炎症

A: 肺泡灌洗液中细胞总数; ***B***: 肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞分类计数;***C-E***: 肺组织HE染色 (箭头所示, 原放大倍数: ×200); ***F***: HE评分半定量评估气道炎症浸润, **P<0.01; ***P<0.001.

2.3 布地奈德降低肺组织的炎症因子水平

用ELISA方法检测肺组织匀浆中Th2相关炎症因子,在哮喘重构模型中,肺组织的IL-4,IL-5,IL-13的表达水平明显升高(P<0.01)。然而,布地奈德干预后,这些炎症因子的表达明显降低(P<0.01,图2)。

2.4 肺组织病理学改

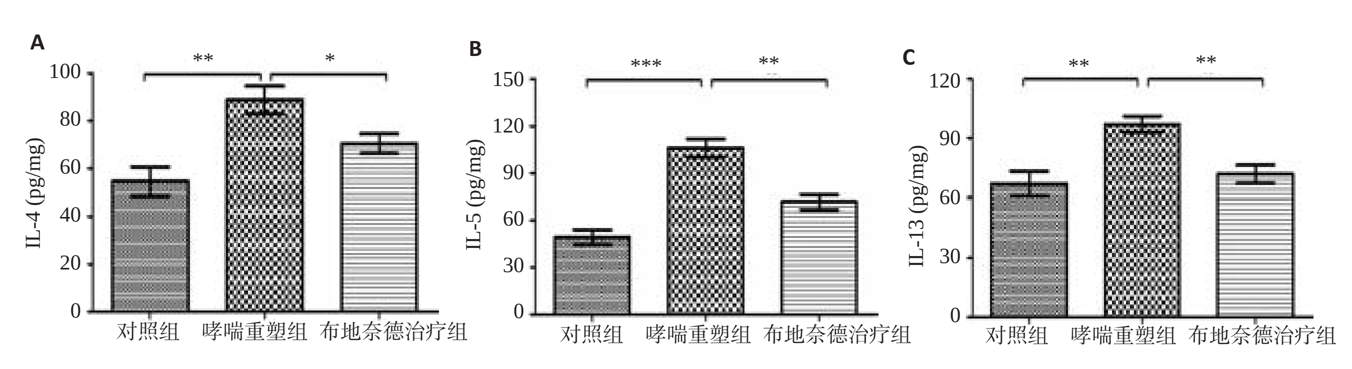


图2 布地奈德缓解气道炎症反应

A: 肺组织匀浆IL-4的表达水平; ***B***: 肺组织匀浆IL-5的表达水平; ***C***: 肺组织匀浆IL-13的表达水平水平的表达. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

在哮喘重构模型中,气管周围大量的胶原沉积,气道粘液高分泌,然而布地奈德治疗后,胶原沉积及粘液分泌明显减少(图3),提示布地奈德能缓解OVA诱导的哮喘模型中的胶原沉积及粘液高分泌。

2.5 Jagged1及Jagged2在肺组织表达

免疫组化结果显示Jagged1及Jagged2在对照组中呈弱阳性表达,而在哮喘组表达明显增强,经布地奈德干预后其表达量有所减少,但仍较对照组多(图4A~H)。进一步用WB检测肺组织Jagged1及Jagged2的表达水平,结果与免疫组化结果一致(图4I-K)。

2.6 相关性分析

进一步应用Spearman相关检验方法分析Jagged1

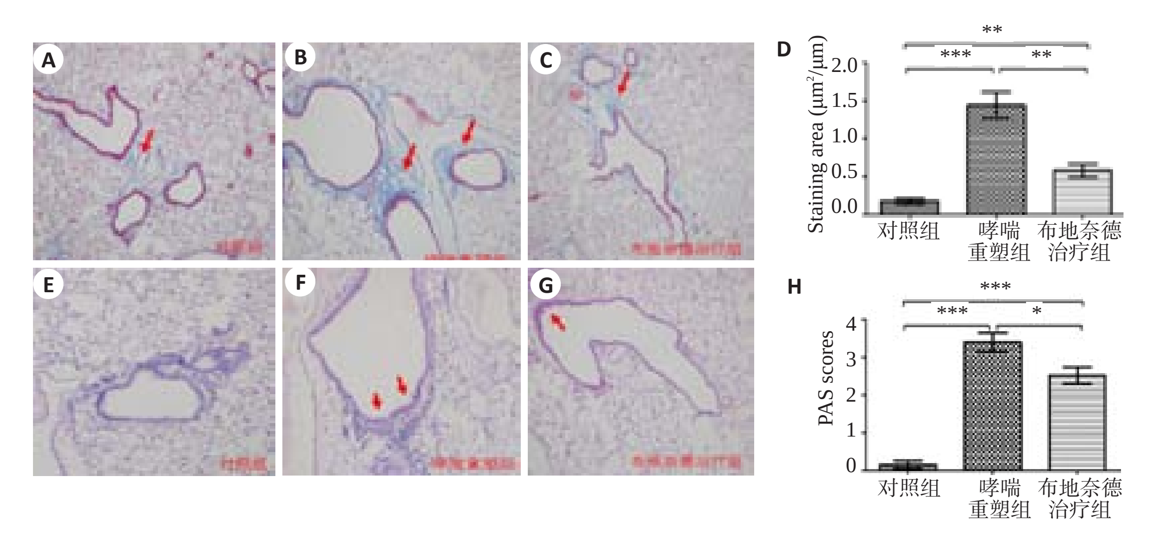


图3 布地奈德缓解哮喘小鼠的胶原沉积及粘液高分泌

A-C: 为肺组织Masson染色(箭头所示,×200倍); ***D***: 为Masson染色的半定量评分; ***E-G***: 为肺组织PAS染色(箭头所示，原放大倍数: ×200); ***H***: 为PAS染色的半定量评分. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Jagged2
Jagged1
Jagged1 阳性细胞占总细胞比例 (%)
Jagged2 阳性细胞占总细胞比例 (%)
Jagged1/β-actin (fold change)
Jagged2/β-actin (fold change)
β-actin
对照组　哮喘重塑组　布地奈德治疗组

图4 布地奈德缓解哮喘小鼠肺组织的Jagged1及Jagged2

A-C, ***E-G***: 用免疫组化方法检测各组小鼠肺组织的Jagged1及Jagged2表达(原放大倍数: ×400); ***I***: 为进一步利用Western Blot方法检测肺组织的Jagged1及Jagged2的蛋白表达水平; ***D***, ***H***, G, ***K***: 为利用Image-pro Plus图像分析软件进行半定量分析Jagged1及Jagged2表达水平. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

及Jagged2表达水平与炎症因子、气道重构指标的相关性。结果显示肺组织的Jagged1及Jagged2表达水平与IL-4/5/13、气道重构相关指标均呈正相关(表1)，提示Jagged1及Jagged2参与哮喘小鼠气道炎症及气道重构过程。

3 讨论

哮喘是由多种细胞(如嗜酸粒细胞、肥大细胞、T细

表1 Jagged1及Jagged2表达水平与炎症因子、气道重构的相关性分析

参数	Jagged1		Jagged2	
	r	*P*值	*r*	*P*值
IL-4	0.75	0.0012	0.60	0.0188
IL-5	0.87	<0.0001	0.72	0.0023
IL-13	0.73	0.0019	0.55	0.0349
HE Scores	0.77	0.0007	0.72	0.0027
Masson Scores	0.86	<0.0001	0.83	0.0001
PAS Scores	0.80	0.0004	0.81	0.0003

胞、中性粒细胞和气道上皮细胞等)和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病,可导致气道反应性的增加,引起气道缩窄[1]。哮喘体内存在着庞大的细胞因子、黏附分子和炎性介质网络系统,通过信号转导通路来调节多种细胞的生长、代谢、增殖和凋亡等功能活动。哮喘的发病机制错综复杂,具体发病机制仍未阐明。

近来研究表明,Notch信号通路在外周T细胞的分化过程中起了决定性的作用,参与多种过敏性疾病(如哮喘)的发生发展。当机体受到细菌、病毒等微生物或寄生虫等变应原感染时会引发特异性免疫反应,由抗原递呈细胞(APC)将信息呈递给外周T细胞,诱导外周CD4+T细胞分化为Thl、Th2、Thl7或Treg细胞,从而产生适应性免疫反应以清除病原体,而T细胞中的信号传递过程由Notch信号通路来完成,且Notch对指导Th1分化和Th2分化均有作用[7-8]。Guo等[9]检测到哮喘小鼠肺组织和肺T细胞中Notehl mRNA和Notch1蛋白水平均显著增高,而敲除Notch1基因后Th2细胞的增殖分化明显受到抑制。Tu等[10]也认为Notch信号在调节2型细胞免疫具有重要作用。且进一步研究发现Notch/RBPJk可通过结合于gata3基因上游外显子1a位点来直接调节Th2型核转录因子GATA3的表达,并与Notch协同增强IL-4的产生[11]。近期的一项研究发现Notch信号通路可赋予肥大细胞抗原递呈功能:将骨髓来源肥大细胞与表达Delta1的中国仓鼠卵巢细胞共培养后BMMC表面表达Notchl/Notch2及MHC-Ⅱ类分子和OX40L明显增多,再将此BMMC与小鼠CD4T细胞混合培养后,T细胞明显活化 增殖并产生IL-4、IL-5、IL-10和IL-13,使极化偏向于Th2细胞方向[12]。本实验通过建立哮喘气道重塑模型,发现哮喘小鼠Notch配体Jagged1及Jagged2表达水平明显增高,且与Th2相关因IL-4、IL-5、IL-13呈正相关,提示Jagged1及Jagged2可能参与了Th2反应,促进哮喘的发病。

气道重塑是目前治疗哮喘的难题,是哮喘除气道慢性炎症之外的另一重要特征。气道重塑发生机制复杂,至今尚未完全清楚。气道重塑在哮喘发病过程中发挥重要作用,是引起症状加重、肺功能下降及治疗疗效差的重要原因。Guseh等[13]通过使小鼠肺上皮表达活化的胞内段,观察到Notch信号可使气道黏液细胞增生、纤毛细胞减少,并进一步用非膜表面的Delta样配体刺激体外培养的小鼠气管后,发现Delta4的刺激也可导致相同的结果。同时,Tsao等[14]通过3种不同方式-Pofutlcnull、Rbpjkcnull和GSI预处理来阻断小鼠体内Notch信号通路,得出了与Guseh等完全相反的结果。由此可见,Notch信号对气道黏液增生有着一定的影响。Notch信号通路对哮喘的影响复杂多样,不同的细胞表达的不同Notch受体与不同的细胞表达的不同Notch配体结合后,所引发的效应也不同。但是,Notch信号通路在气道重塑中的作用尚未阐述清楚。本实验通过建立哮喘气道重塑模型,发现Jagged1及Jagged2表达水平与哮喘小鼠的胶原沉积和气道粘液呈正相关,提示Jagged1及Jagged2可能参与了哮喘的气道重构的发病。

糖皮质激素是目前最有效的抗炎药物,但它对防治气道重塑机制目前仍不十分明确。布地奈德是一种非卤代化的糖皮质激素,具有局部浓度高,不良反应少,是目前控制和缓解哮喘发作的关键药物[6]。本研究发现布地奈德干预后,哮喘小鼠的气道炎症、气道重构明显缓解,同时肺组织的Jagged1及Jagged2表达水平也明显下降,表明布地奈德改善哮喘小鼠气道炎症、气道重构可能与降低Jagged1及Jagged2表达有关。

综上所述,Jagged1及Jagged2在哮喘气道重塑中表达增加,可能参与哮喘气道炎症反应、胶原沉积及黏液细胞增殖。布地奈德治疗能抑制Jagged1及Jagged2的表达,从而可能抑制气道炎症反应、胶原沉积及黏液细胞的增殖。但布地奈德是通过何种途径抑制Jagged1及Jagged2表达有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 钟南山,王 辰.呼吸内科学[M].北京:人民卫生出版社,2008:86-9.

[2] Gazave E, Lapébie P, Richards GS, et al. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes[J]. BMC Evol Biol, 2009, 9(4): 249-53.
[3] Chillakuri CR, Sheppard D, Lea SM, et al. Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies[J]. Semin Cell Dev Biol, 2012, 23(4): 421-8.
[4] Xu K, Moghal N, Egan SE. Notch signaling in lung development and disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 727(8): 89-98.
[5] Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(2 Pt 1): 627-35.
[6] 沈华浩, 王绍斌. 布地奈德干预对卵白蛋白致敏小鼠抗原激发后气道炎症及气道重塑的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(3): 154-9.
[7] Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. Notch signaling in the immune system[J]. Immunity, 2010, 32(1): 14-27.
[8] Amsen D, Antov A, Flavell RA. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(2): 116-24.
[9] Guo XJ, Zhou M, mediated KL, et al. Small interfering RNA of Notchl in lung[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(21): 2647-51.
[10] Tu L, Fang TC, Artis D, et al. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity[J]. J Exp Med, 2005, 202(8): 1037-42.
[11] Fang TC, Yashiro OY, Del BC, et al. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation[J]. Immunity, 2007, 27(1): 100-10.
[12] Nakano N, Nishiyama C, Yagita H, et al. Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 123(1): 74-81.
[13] Guseh JS, Bores SA, Stanger BZ, et al. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development[J]. Development, 2009, 136(10): 1751-9.
[14] Tsao PN, Vasconcelos M, Izvolsky KI, et al. Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways[J]. Development, 2009, 136(13): 2297-307.

（上接396页）

参考文献：

[1] 冯华青, 戴 亮, 马少华, 等. 食管癌术后早期肠内营养对肠功能恢复的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2012, 15(9): 957-9.
[2] 黎介寿. 肠内营养--外科临床营养支持的首选途径[J]. 中国实用外科杂志, 2003, 23(2): 67-70.
[3] 李志红, 皮亚平. 胃癌术后早期肠内及肠外营养支持的疗效观察[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(8): 1939-40.
[4] 汪亚雄. 四磨汤对腹部手术术后胃肠功能恢复的影响[J]. 中医药导报, 2009, 15(7): 27-8.
[5] 章新星, 刘伟中. 国内老年人胃癌术后早期肠内营养系统评价[J]. 南昌大学学报, 2014, 54(1): 55-60.
[6] Christensen HK, Thaysen HV, Rodt SÅ, et al. Short hospital stay and low complication rate are possible with a fully implemented fast-track model after elective colonic surgery[J]. Eur Surg Res, 2011, 46(3): 156-61.
[7] Gouvas N, Tan EM, Windsor A, et al. Fast-track vs standard care in colorectal surgery: a meta-analysis update[J]. Int J Colorectal Dis, 2009, 24(10): 1119-31.
[8] Chopra SS, Schmidt SC, Fotopoulou C, et al. Evidence-based perioperative management: strategic shifts in times of fast track surgery[J]. Anticancer Res, 2009, 29(7): 2799-802.
[9] 胡庆华, 王 韬. 术前四磨汤保留灌肠促进腹部术后胃肠功能恢复的观察[J]. 陕西中医, 2012, 33(5): 525-6.